

Aus: Medizinische Klinik und Poliklinik
der Freien Universität im Klinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. R. Schröder

Grenzen einer quantitativen
densitometrischen Auswertung von
Lipoproteinelektropherogrammen auf
Celluloseacetat-Membranen für die
Diagnose der Hyperlipoproteinämien.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfram Knöchel
Essen

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548401_0019

Aus: Medizinische Klinik und Poliklinik
der Freien Universität im Klinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. R. Schröder

**Grenzen einer quantitativen
densitometrischen Auswertung von
Lipoproteinelektropherogrammen auf
Celluloseacetat-Membranen für die
Diagnose der Hyperlipoproteinämien.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfram Knöchel

Essen

Referent: Prof. Dr. R. Schröder

Korreferent: Prof. Dr. W. Schwartzkopff



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 15. 9. 1978

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Dr. U. Klemens im Klinikum Steglitz (Cardio-Pulmonologische Abteilung, Leiter: Prof. Dr. R. Schröder) der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Dr. Klemens danke ich sehr für die Überlassung des Themas und die mir für die Durchführung der Arbeit zur Verfügung gestellten Möglichkeiten und Mittel

Nach dem Tode von Dr. U. Klemens konnte die vorliegende Arbeit nur mit der hilfreichen Unterstützung von Dr. R. Arntz, Freie Universität Berlin, vollendet werden. Ihm möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen.

Inhaltsübersicht

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1 - 8
2. <u>Methoden und Material</u>	9
2.1. Blutgewinnung	9
2.2. Lipidanalysen	9
2.3. Lipoproteinelektrophorese	9
2.3.1. Prinzip	9 - 10
2.3.2. Arbeitsvorschrift	10 - 11
2.3.3. Reagentien	11
2.3.4. Geräte	11 - 12
2.4. Präparative Ultrazentrifuge	12
2.4.1. Prinzip	12
2.4.2. Arbeitsvorschrift	12 - 13
2.4.3. Berechnungen	13 - 15
2.4.4. Reagentien	15
2.4.5. Geräte	15
3. <u>Ergebnisse</u>	16
3.1. Reproduzierbarkeit der Lipidelektropherogramme	16
3.2. Auflösungsvermögen	16 - 19
3.3. Quantitativer Vergleich	20 - 30
4. <u>Diskussion</u>	31 - 33
5. <u>Zusammenfassung</u>	34
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	35 - 36

1. Einleitung

Hohe Cholesterin- und Triglyceridkonzentration im Serum haben in den letzten Jahren vor allem aus präventivmedizinischer Sicht erheblich an Bedeutung gewonnen.

Spezifische bzw. unspezifische Symptome (z.B. Xanthome bzw. Hepatomegalie) bei Hypercholesterinämien bzw. Hypertriglyceridämien stehen dabei weniger im Vordergrund, weil sie seltener sind und im Gegensatz zu den kardiovaskulären Erkrankungen quoad vitam keine entscheidende Bedeutung haben.

Die wesentliche Bedeutung hoher Cholesterin- und Triglyceridspiegel besteht darin, daß das Risiko gegenüber arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen (koronaren Herzerkrankungen, peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen) gesteigert wird.

Durch eine Anzahl von Studien (1-10) konnten diese Zusammenhänge erhärtet werden.

Man unterscheidet sekundäre (symptomatische und primäre Hyperlipoproteinämien. Sekundäre Formen sind Folge verschiedener Grunderkrankungen (11, 12) oder können z.B. auch im Zusammenhang mit Alkoholabusus auftreten. (13). Bei ihnen führt die Behandlung der Grunderkrankung häufig zu einer Lipidsenkung im Serum.

Bei den primären Formen liegen keine derartigen Grunderkrankheiten vor, Ergänge wurden beschrieben (14). Die Diagnose einer primären Hyperlipoproteinämie wird indirekt durch den Ausschluß von Grunderkrankungen mit sekundärer Hyperlipidämie gestellt. Familiäre Formen setzen den Nachweis von Erbgängen voraus.

Während sich die Diagnostik der Fettstoffwechselstörungen weitgehend auf den Nachweis erhöhter Lipid-

werte im Serum beschränkte, ermöglicht der Nachweis bestimmter Lipoproteinfraktionen im Serum eine Typisierung der Fettstoffwechselstörungen und hat Bedeutung für Prognose und Therapie.

Cholesterin und Triglyceride sind als organische Substanzen im wässrigen Milieu, also auch im Serum, nicht löslich. Sie benötigen Lösungsvermittler. Diese Funktion wird von bestimmten Proteinen, den Apolipoproteinen, übernommen.

Proteine und Lipide bilden komplexe Verbindungen, die als Lipoproteine bezeichnet werden. Sie stellen die Transportform der Lipide im Serum dar.

Im wesentlichen unterscheidet man folgende 4 Lipoproteinfraktionen im Serum, die je nach dem verwendeten Trennverfahren als α - (HDL)^x, β - (LDL)^{xx}, prae- β - (VLDL)^{xxx} - Lipoproteine und Chylomikronen bezeichnet werden. Hauptlipidbestandteil der α - Lipoproteine sind Phosphatide, der β - Lipoproteine Cholesterin. In den prae- β - Lipoproteinen und Chylomikronen werden vor allem Triglyceride transportiert.

Die Triglyceride der prae- β - Lipoproteine stammen aus der Leber (endogene Triglyceride), die Triglyceride der Chylomikronen hingegen aus den enteral resorbierten und in der Darmmukosa resynthetisierten Nahrungsglyceriden (exogene Triglyceride).

x = High Density Lipoprotein

xx = Low Density Lipoprotein

xxx = Very Low Density Lipoprotein

Nach Fredrickson unterscheidet man fünf verschiedene Hyperlipoproteinämietypen (Typ I bis V), die durch die Erhöhung bestimmter Lipoproteinfraktionen im Serum charakterisiert sind (Abb. 1).

	I	IIa	IIb	III	IV	V
Chylo	↑					↑
α -Lipopr			((↓))	((↓))	((↓))	((↓))
prae- β -Lipopr			↑		↑	↑
β -Lipopr		↑	↑			
atyp.Lipopr				↑		
Serum	rahmig	klar	klar-trübe	trübe-rahmig	trübe-milchig	milchig-rahmig

Abb. 1: Hyperlipoproteinämie-Typen
Charakteristische Erhöhung von Lipoprotein-
Fraktionen

Entscheidend wichtig ist, daß diese Typisierung nach rein analytischen Kriterien durchgeführt wird. Man sollte deshalb besser von Hyperlipoproteinm u s t e r n vom Typ I bis Typ V sprechen. Diese Muster gelten sowohl für die primären als auch für die sekundären Formen.

Ob diese formale Typisierung nach Fredrickson in der beschriebenen Form aufrecht erhalten werden kann, wird sich zeigen, wenn eine angestrebte pathogenetische Einteilung vorliegen wird.

Beim Typ I scheint eine einheitliche Pathogenese vorzuliegen. Es konnte ein Defekt im Lipoproteinlipasesystem nachgewiesen werden. Durch eine reduzierte Enzymaktivität kommt es zu einem verminderten Abbau von exogenen Triglyceriden und somit zu einer persistierenden Chylomikronämie (16).

Beim primären Typ II konnte an einem Versuchsmodell

mit Fibroblasten gezeigt werden, daß wahrscheinlich über eine verminderte Haftung der LDL an den Zellmembranen (Rezeptordefekt?) die Einschleusung der LDL in die Zelle verringert wird (17).

Daraus resultieren 2 Effekte:

1. reduzierter Abbau der β -Lipoproteine und
2. geringerer Hemmeffekt auf die HMG-Co A Reduktaseaktivität als Folge niedriger intrazellulärer LDL bzw. Cholesterinkonzentration.

Beim primären Typ III handelt es sich um die Bildung eines atypischen Lipoteins, das elektrophoretisch im Bereich der β -Bande wandert (floating- β).

Beim primären Typ IV ist die Pathogenese noch weitgehend ungeklärt. Ursache dieser endogenen Hypertriglyceridämie könnte ein verzögerter Abstrom der Triglyceride aus dem Blut ins Gewebe und (oder) eine Synthesesteigerung sein.

Der Typ V zeigt ein variables Bild. In einigen Fällen konnte eine verminderte Lipoproteinlipaseaktivität nachgewiesen werden. Unter Therapieeinfluß kann das Lipoproteinmuster des Typ V dem des Typ IV ähnlich werden. Seine Bedeutung für die Arteriosklerose ist umstritten. Unabhängig von der Frage, ob die Einteilung der Hyperlipoproteinämien nach dem Fredrickson-Schema bei Zugrundelegung von pathogenetischen Kriterien in dieser Form beibehalten werden kann, hat sie sich als Zwischenlösung bewährt.

Wie die Abbildungen 2 und 3 zeigen, differieren die Symptommatologie, klinische Bedeutung und die Therapie bei den verschiedenen Hyperlipoproteinämietypen. Die Klassifizierung in 5 Typen erwies sich also auch für den Kliniker als sinnvoll.

Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV	Typ V
Hepatosplenomegalie	Xanthelasmen und Sehnenxanthome	gelbe Handlinien	tuberöse Xanthome	eruptive Xanthome
abdominelle Krisen	arcus lipoides	eruptive Xanthome	(häufig Entzündungszeichen mit rotem Hof)	(Gesäß, Schulter, Knie)
eruptive Xanthome	Risikofaktor für DCVE ^x	Risikofaktor für DCVE	Risikofaktor für DCVE	abdominelle Krisen
Lipäemia retinalis			Glukosetoleranzstörungen	

Abb. 2: Klinische Symptommatologie bei Hyperlipoproteinaemie-Erkrankungen

x = Degenerative cardiovasculäre Erkrankungen (DCVE)

Diät-Therapie		Medikamentöse Therapie
Typ I	maximal 20-30 g Fett/die (fettarme Diät mittelkettige FS)	Ø
Typ II	a) Reduktion des Cholesterins (unter 300 mg%) Reduktion der Gesamtfettzufuhr (vor allem der gesättigten Fett- säuren; Ersatz durch Polyen- säuren) b) Kohlenhydrateinschränkung, sonst wie IIa	Nicotinsäure D-Thyroxin Cholestyramin -Sitosterin Neomycin
Typ III	wie Typ II b	Clofibrat
Typ IV	Einschränkung der Kohlenhy- drat- und Alkoholzufuhr Gewichtsreduktion	Clofibrat (Biguanide?)
Typ V	Kohlenhydrat- und fettarme Kost mittelkettige Fettsäuren	Clofibrat Nikotinsäure

Abb. 3: Therapie der Hyperlipoproteinämien

Wie schon erwähnt, ist durch den Nachweis der jeweils erhöhten Lipoproteinfraktion(en) eine über die Lipidbestimmung hinausgehende Differenzierung möglich.

Dazu stehen im wesentlichen zwei Methoden zur Verfügung,

- 1.) die Lipoprotein-Elektrophorese,
- 2.) die Ultrazentrifugation.

In neuerer Zeit werden auch für einzelne Fragestellungen Präzipitationsverfahren angewendet, auf die hier im einzelnen nicht eingegangen werden soll.

ad 1.) Zur elektrophoretischen Trennung werden
Papier- (18), Agarose-Gel (19, 20, 21),

Celluloseacetat-Membranen (26, 27, 28) sowie Polyacrylamidgel verwendet (22, 23, 24, 25). Die Diagnose eines Hyperlipoproteinaemietyps erfolgt dabei durch Betrachten des Lipidelektropherogrammes unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Triglycerid- und Cholesterinkonstellation im Plasma. Erhöhte Lipoproteinfraktionen sind durch sich stärker abzeichnende Banden erkennbar.

ad 2.) Die Trennung der Lipoproteine in der Ultrazentrifuge beruht auf einer unterschiedlichen Dichte der einzelnen Lipoproteinfraktionen. Man spricht deshalb von Lipoproteinen hoher Dichte, den HDL (high density LP), von Lipoproteinen niedriger Dichte, den LDL (low density LP), von Lipoproteinen niedriger Dichte, den LDL (low density LP) und von den VLDL (very low density LP).

Die HDL-Fraktion entspricht der elektrophoretisch getrennten α Fraktion, die LDL Fraktion der β - und die VLDL-Fraktion der prae- β -Fraktion.

Die Ultrazentrifugation mit anschließender Messung der Lipidwerte in den getrennten Fraktionen liefert quantitative Angaben über die Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteine. Sie erfordert aber erheblichen Arbeitsaufwand und teure Geräte. Sie kann deshalb nicht in allen Krankenhauslaboratorien durchgeführt werden. Anhand der Lipoproteinelektrophorese auf Celluloseacetat-Membran wurde überprüft, ob Lipoproteinelektropherogramme quantitativ auswertbar sind, um sie für eine exakte Typendifferenzierung verwenden zu können. Dazu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- a) Reproduzierbarkeit der Lipoproteinelektropherogramme
- b) Auflösungsvermögen der Lipoproteinbanden
- c) quantitativer Vergleich der relativen Extinktionen der α -, $\text{prae-}\beta$ - und β -Lipoproteine nach elektrophoretischer Trennung mit den relativen Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL nach Ultrazentrifugation.

2. Methoden und Material

2.1. Blutgewinnung

Nach zwölfstündiger Nahrungskarenz werden ca. 10 ml venöses Blut abgenommen und zur Vermeidung der Blutgerinnung mit Heparin oder EDTA versetzt. Nach Abkühlung auf 5°C wird die Blutprobe (2000 g) 15 Minuten lang in einer Stockzentrifuge zentrifugiert. Das Material wurde innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet.

2.2. Lipidanalysen

Triglyceridbestimmung: Es wird eine enzymatisch-optische Methode angewandt, die von Kreutz (29) beschrieben und von Schmidt (30) modifiziert wurde (Testkombination der Fa. Boehringer, Mannheim).

Cholesterinbestimmung: Es handelt sich um eine modifizierte Methode nach Liebermann-Burchardt (Testkombination von der Fa. Boehringer, Mannheim, Nr. 15949).

Phosphatidbestimmung: Verwandt wird die Testkombination der Fa. Boehringer nach der Methode von Bogatzki und Zilver Smith (31). Zur Kontrolle wurden Standardseren (Praezilip-, Hylandseren) eingesetzt.

2.3. Lipoproteinelektrophorese

2.3.1. Prinzip

Die Trennung der Lipoproteine beruht auf ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit. Die Lipoproteinelektrophorese ist vom Prinzip her Eiweisselektrophoresen ver-

gleichbar. Als Farbstoff wird jedoch Ölröt 0 verwendet, ein Diazofarbstoff, welcher den Lipidanteil der Lipoproteine färbt. Der überschüssige Farbstoff wird mit Natriumhypobromitlösung von der Membran entfernt.

2.3.2. Arbeitsvorschrift (32, 26)

Celluloseacetat-Membranen (Sephraphore III, Gelman Instrument Company) werden in Elektrodenpuffer 20 Minuten lang luftblasenfrei getränkt und danach leicht mit Filterpapier getrocknet. Mit dem Applikator (Firma LKB) wird die Probe 5,5 cm vom Kathodenende der Membran entfernt, aufgetragen. Je nach der Lipidkonzentration im Plasma liegt die aufzutragende Menge zwischen 5 und 15 μ l, das entspricht einem ein- bis dreimaligem Aufsetzen des Applikators.

Anschliessend werden die Membranstreifen so in die Elektrophoresekammer eingelegt, dass beide Enden in die Elektrodenpuffer eintauchen.

Die elektrophoretische Trennung wird bei konstanter Spannung von 150 Volt, das entspricht ungefähr einer Stromstärke von 2 mA pro Streifen, bei Raumtemperatur und einer Laufzeit von 120 Minuten durchgeführt.

Danach werden die Membranen nass in das Färbegut gelegt und ca. 12 Stunden bei 40°C (Wärmeschrank) gefärbt.

Anschliessend werden die Membranen unter Schwenken in dem Entfärbegut etwa eine Minute gebleicht, bis sie nur noch leicht rötlich sind. Die Banden treten deutlich hervor. Es folgt ein Bad unter fließendem Wasser für 30 Minuten, dabei wird das überschüssige Natriumhypobromit ausgewaschen. Danach werden die Membranen unter einem Föhn getrocknet. Es folgt das Transparenzbad, die getrockneten Membranen werden für zwei bis fünf Sekunden einge-

taucht und dann sofort luftblasenfrei auf einen Objektträger aufgezogen.

Eventuelle Farbstoffschlieren werden mit einem Glasstab abgestreift. Nach dem Erwärmen mit einem Föhn oder im Wärmeschrank bei 50°C werden sie innerhalb kurzer Zeit transparent. Bei ungenügender Transparenz genügt ein nochmaliges kurzes Eintauchen mit dem Objektträger in das Transparenzbad.

2.3.3. Reagentien

Elektrodenpuffer: 0,07 M Veronal-Puffer, pH 8,6.
25,172 g Barbital-Natrium (Fa. Merck) und 180 ml 0,1 N HCL mit demin. Wasser auf 1,6 l auffüllen; nach Korrektur des pH-Wertes auf 8,6 weiter mit demin. Wasser auf 2 l auffüllen.

Färbebad: 0,4 g Ölrot O (Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim) werden in 700 ml Methanol gelöst. Mit demin. Wasser auf 1 l auffüllen, kräftig durchmischen und am Rückflusskühler kurz aufkochen lassen. Ein Abfiltrieren des ungelösten Farbstoffes ist nicht erforderlich.

Die Färbelösung muss bei 40°C aufbewahrt werden, sie sollte jeden 2. Tag frisch angesetzt werden.

Entfärbebad: Natriumhypobromit-Lösung.

5 ml Brom (Fa. Merck) werden mit 10 %iger NaOH auf 100 ml aufgefüllt. Unmittelbar vor der Entfärbung werden von dieser Lösung 10 ml mit 200 ml 5 %iger Essigsäure versetzt.

Transparenzbad: 45 ml Essigsäureanhydrid werden mit reinem Methanol auf 350 ml aufgefüllt.

2.3.4. Geräte

Elektrophoresekammer: Benutzt wird die Universal-Elektrophoresekammer der Fa. Shandon, Labortechnik, Frankfurt.

Spannungsgerät: Stabilisiertes Spannungsgerät der Firma Shandon (Vokam 2541).

Extinktionsschreiber 3 mit Integralschreiber:
Fa. Carl Zeiss.

Applikator: Firma LKB

Rückflusskühler mit Kolben: Zum kurzen Aufkochen der Ölrot-O-Lösung.

Wärmeschrank: Einzustellen auf 40°C.

2.4. Präparative Ultrazentrifuge

2.4.1. Prinzip

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Lipoproteine ermöglicht die Ultrazentrifugation des Plasmas die Trennung der Plasmalipoproteine in drei Haupt-Fraktionen. Man unterscheidet: High density Lipoproteine (HDL), low density Lipoproteine (LDL) und very low density Lipoproteine (VLDL).

	HDL	LDL	VLDL
Dichte g/ml	1,064 - 1,21	1,006 - 1,062 S _F 0 - 20	0,9 - 1,006 S _F 20 - 400
Mittleres Lipid/Protein- verhältnis	50/ 50	80/ 20	95/ 5

Abb. 4: Dichtespektrum, Flotationsrate und Lipid-Protein-Verhältnis der Lipoproteine

2.4.2. Arbeitsvorschrift

Havel (33), De Lalla, Gofman (34).

In zwei Zentrifugenröhrchen wird jeweils 5 ml Plasma

gegeben und auf eine Dichte von $d = 1,006$ bzw. $d = 1,063$ eingestellt. Da die Dichte des Plasmas $d = 1,006$ beträgt, wird im ersten Fall mit 0,9 %iger Kochsalzlösung aufgefüllt. Um die Dichte $d = 1,063$ einzustellen, wird auf 5 ml Plasma 1 ml Lösung der Dichte $d = 1,346$ ins Zentrifugenröhrchen gegeben und mit Lösung der Dichte $d = 1,063$ aufgefüllt. Beide Proben werden gleichzeitig in der präparativen Ultrazentrifuge bei 4°C und 40 000 RPM 12 Stunden lang zentrifugiert.

Es bilden sich jeweils drei Phasen.

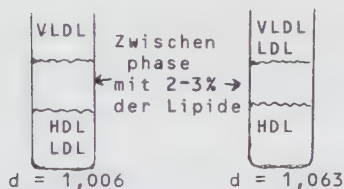


Abb. 5: Phasenbildung nach Ultrazentrifugation
bei den Dichten $d = 1,006$ und $d = 1,063$

Die einzelnen Phasen werden mit der Hälfte der Zwischenphase abgesaugt. Die Bestimmung der Triglycerid-, Cholesterin- und Phosphatidwerte wird nach den beschriebenen optisch-enzymatischen bzw. calorimetrischen Methoden durchgeführt (siehe Seite 9).

2.4.3. Berechnungen

(Korrekturberechnungen, Berechnung der Konzentration der Lipidanteile der HDL, LDL und VLDL und Berechnung des relativen Lipidanteils der HDL, LDL und VLDL an der gesamten Lipidkonzentration).

Korrektur nach recovery: Die Lipidmengen der einzelnen Ultrazentrifugenfractionen werden nach der

recovery korrigiert, die zwischen 8% - 103% der eingesetzten Mengen beträgt.

$$\frac{\text{Eingesetzte Menge TG (Chol., Phosph.)}}{\text{wiedergefundene Menge TG (Chol., Phosph.)}} = \text{Korrekturfaktor}$$

In der UZ-Fraktion (d 1,006) wird die Summe der nach der recovery korrigierten Mengen an Triglyceriden, Cholesterin und Phosphatiden gebildet. Sie entspricht der VLDL-Lipidmenge, die in 5 ml zur Ultrazentrifugation eingesetzt wurde.

Berechnung der Konzentration des Lipidanteils der VLDL im Plasma (mg/100 ml Plasma): Die Summe der nach der recovery korrigierten Mengen TG, Cholesterin, Phosphatide aus der UZ-Fraktion (bei d 1,006) = Menge Lipid der VLDL im eingesetzten Plasmavolumen.

Daraus lässt sich die Konzentration der VLDL im Plasma wie folgt berechnen:

$$\frac{\text{Lipidmenge der VLDL}}{\text{eingesetztes Plasmavolumen}} \times 100 = \text{Konzentration des VLDL-Lipidanteils im Plasma (mg/100 ml)}$$

Die Berechnung der Konzentration der HDL im Plasma erfolgt entsprechend der geschilderten Berechnung der Konzentration des Lipidanteils der VLDL im Plasma, nur wird die korrigierte Menge TG, Cholesterin, Phosphatide aus der unterstehenden Phase bei d = 1,063 verwendet.

Berechnung der Konzentration der LDL im Plasma: Die LDL kommen in keiner Fraktion isoliert vor. In der Fraktion d 1,006 liegen HDL und LDL, in der Fraktion d 1,063 HDL vor. Die LDL können durch Differenzbildung berechnet werden. Die Summe der durch Differenzbildung gefundenen TG-, Cholesterin- und Phosphatidmengen entspricht der Lipidmenge der LDL im eingesetzten Plasmavolumen. Voraussetzung für diese Berechnung ist der Einsatz gleicher Volumina Plasma bei der Ultrazentrifugation. Die Konzentration der

LDL-Lipide im Plasma kann wie folgt berechnet werden:

$$\frac{\text{Lipidmenge der LDL}}{\text{eingesetztes Plasmavolumen}} \times 100 = \text{Konzentration der LDL im Plasma (mg/100 ml)}$$

Berechnung der HDL-, LDL- und VLDL-Lipide in % der Gesamtlipidkonzentration (= 100%): Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel

Konzentration des Lipidanteils der Einzelfraktion $\times 100 =$
Summe VLDL-, LDL-, HDL-Gesamtlipidkonzentration

2.4.4. Reagentien

- a) physiologische Kochsalzlösung (d = 1,005)
- b) Lösung der Dichte d = 1,063:
42,5 g NaCl werden mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt.
- c) Lösung der Dichte d = 1,346:
35,4 g KBr und 15,3 g NaCl auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen.

2.4.5. Geräte

Ultrazentrifuge: Spinco L 65 (Fa. Beckmann)
Rotor: Ti 50
Photometer: Eppendorf 1000

3. Ergebnisse

3.1. Reproduzierbarkeit der Lipidelektropherogramme

Es wurden jeweils 30 Lipidelektrophoresen unter Standardbedingungen von einer Normalperson und Patienten mit Typ IIa, IIb und IV durchgeführt und densitometrisch ausgewertet.

Die Typisierung war zuvor unter Standardbedingungen in der Fettstoffwechselambulanz des Klinikum Steglitz erfolgt.

Wie Tabelle 1 zeigt, liegt die Standardabweichung in brauchbaren Grenzen.

Lipoproteinfraktion	Normal	Typ IIa	Typ II b	Typ IV
α	$38,5 \pm 3,8$	$11,8 \pm 2,4$	$20,2 \pm 4,3$	$24,0 \pm 3,9$
β	$48,6 \pm 4,8$	$81,2 \pm 3,7$	$57,5 \pm 5,5$	$42,9 \pm 4,0$
prae- β	$12,9 \pm 3,2$	$7,0 \pm 1,7$	$22,3 \pm 2,8$	$33,0 \pm 4,2$

Tab. 1: Densitometrische Auswertung von jeweils 30 Lipidelektropherogrammen. Angegeben sind die Mittelwerte der relativen Extinktionen (in % der Gesamtextinktion) der verschiedenen Lipoproteinfraktionen.

3.2. Auflösungsvermögen

Ohne eine deutliche Trennung der Lipoproteinbanden bei der Elektrophorese ist eine densitometrische Auswertung nicht möglich. Von primären Hyperlipoproteinämien der verschiedenen Typen und Normalpersonen wurden Lipoproteinelektropherogramme angefertigt und die Lipoproteinbanden densitometrisch gemessen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

	Normal- pers.	Typ IIa	Typ IIb	Typ III	Typ IV (TG) < 1000mg/ 100 ml	Typ IV (TG) > 1000mg/ 100ml	Typ V
	n=100	n=66	n=106	n=20	n=169	n=60	n=20
scharfe Banden- trennung	98	88	50	0	81	45	0
doppelte prae- Bande	2	0	17	0	8	1	0

Tab. 2: Auflösungsvermögen der Lipoproteinelektrophorese auf Celluloseacetatmembranen und Häufigkeit einer doppelten prae- β -Bande bei Normalpersonen und verschiedenen Hyperlipoproteinämie-Typen. Angegeben ist die Prozentzahl der Fälle, bei denen eine scharfe Bandentrennung die densitometrische Auswertung zulässt bzw. eine doppelte prae- β -Bande gefunden wurde. (TG) = Triglyceridkonzentrationen im Plasma, n = Zahl der untersuchten Fälle

Bei Normalpersonen und solchen mit Typ IIa war in den meisten Fällen eine scharfe Trennung der Banden zu beobachten.

Der Typ IV wurde in einen hochgradigen Typ IV (TG > 1000 mg/100 ml) und einen geringgradigen Typ IV (TG 1000 < mg/100 ml) aufgegliedert. Bei hohen Triglyceridwerten setzt ein tailing der prae- β -Bande zur Startlinie ein; das tailing tritt ab einer TG-Konzentration von 1500 mg/100 ml auf. Beim hochgradigen Typ IV waren die Banden nur bei etwa 50% der Fälle gut voneinander getrennt. Bei Triglyceridwerten unter 1000 mg% war dagegen das Auflösungsvermögen wesentlich besser. Der Typ III und der Typ V waren densitometrisch nicht auswertbar, Typ IIb zu 50%.

Die nachstehenden Abbildungen zeigen Beispiele von Elektropherogrammen von verschiedenen Hyperlipoproteinämietypen und einer Normalperson sowie Extinktionskurven.

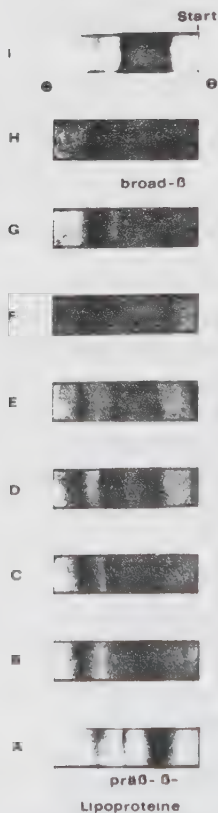


Abb. 6: Lipoproteinelektropherogramme auf Zelluloseacetat-Membranen

- | | |
|------------------|---|
| A) Normalplasma: | TG 95 mg/100 ml, |
| | Chol 230 mg/100 ml |
| B) Typ IIa | : TG 67 mg/100 ml, |
| | Chol 652 mg/100 ml |
| C) Typ IV | : TG 420 mg/100 ml, |
| | Chol 270 mg/100 ml |
| D) Typ IV | : TG 390 mg/100 ml, |
| | Chol 250 mg/100 ml |
| E) Typ IIb | : TG 320 mg/100 ml, |
| | Chol 340 mg/100 ml, |
| | β -Chol 230 mg/100 ml |
| F) Typ IIb | : TG 320 mg/100 ml, |
| | Chol 365 mg/100 ml, |
| | β -Chol 365 mg/100 ml |
| G) Typ IIb | : TG 252 mg/100 ml, |
| | Chol 330 mg/100 ml, |
| | β -Chol 220 mg/100 ml |
| H) Typ IIb | : TG 505 mg/100 ml, |
| | Chol 575 mg/100 ml, |
| | β -Chol 162 mg/100 ml |
| | Triglycerid/Cholesterinquotient der VLDL: 1,2 |
| I) Typ III | : TG 851 mg/100 ml, |
| | Chol 490/100 ml, |
| | β -Chol 162 mg/100 ml |
| | Triglycerid/Cholesterinquotient der VLDL: 2,0 |

Die doppelte prä- β -Bande der Ziff. B und G floriert bei der Ultrazentrifugation bei $D = 1,006$.

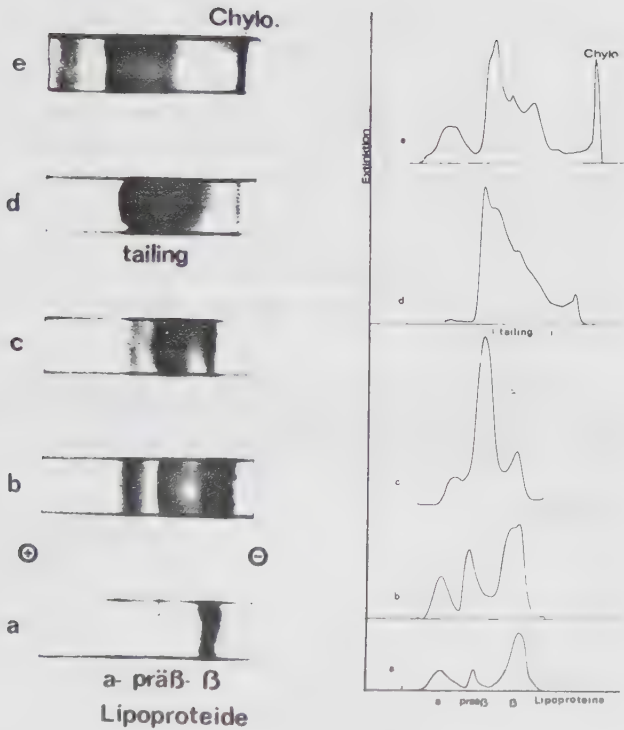


Abb. 7 und 8: Beispiele von Elektropherogrammen mit Extinktionskurven

- a) Normalplasma (TG: 106 mg % Chol.: 165 mg %);
- b) geringgradiger Typ IV (TG: 347 mg % Chol.: 290 mg %);
- c) hochgradiger Typ IV (TG: 1449 mg % Chol.: 353 mg %);
- d) hochgradiger Typ IV mit tailing (TG: 2306 mg % Chol.: 365 mg %);
- e) Typ V (TG: 846 mg % Chol.: 151 mg %).

3.3. Quantitativer Vergleich

Vorangehende Untersuchungen (35) hatten bei einem Kollektiv von 33 Patienten (Normalpersonen, Typ II, III und Typ IV) gute Korrelationen der relativen Extinktionen der α -, prae- β - und β -Banden mit den relativen Konzentrationen der Lipidkomponenten der HDL, VLDL und LDL gezeigt. Die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,940 und 0,990. Diese Ergebnisse schienen die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung der Elektrophoresen anzudeuten. Deshalb wurden getrennt bei den verschiedenen HL - Typen die relativen Extinktionen der α -, prae- β - und β -Lipoproteinbanden (in% der Gesamt-extinktion) mit den relativen Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL (Gesamtlipide = 100%) verglichen.

Nur die densitometrisch gut auswertbaren Lipoproteinelektropherogramme wurden für den quantitativen Vergleich verwendet.

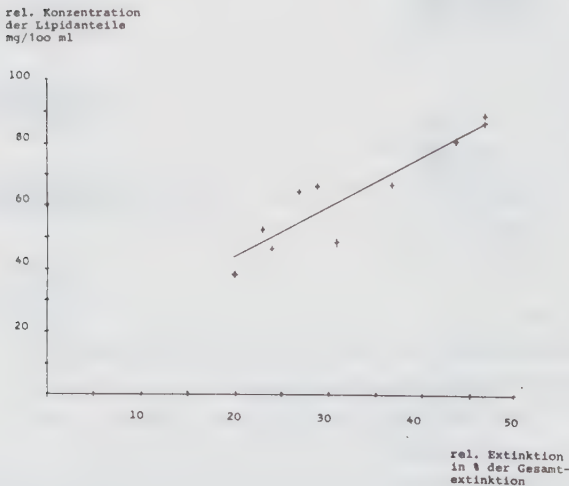


Abb. 9:
Normaltyp α LP/HDL n = 10
Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

rel. Konzentration
der Lipidanteile
mg/100 ml

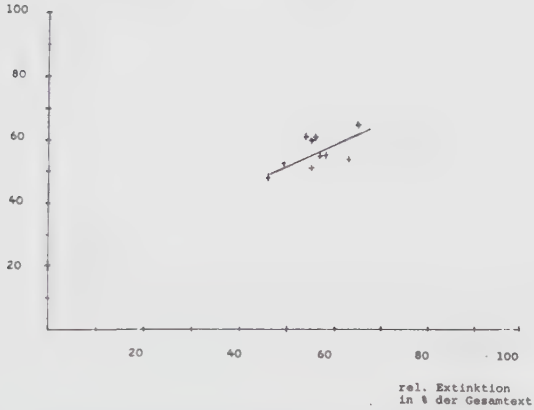


Abb. 10: Normaltyp β LP/LDL $n = 10$
Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der
Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der
Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

rel. Konzentration
der Lipidanteile
mg/100 ml

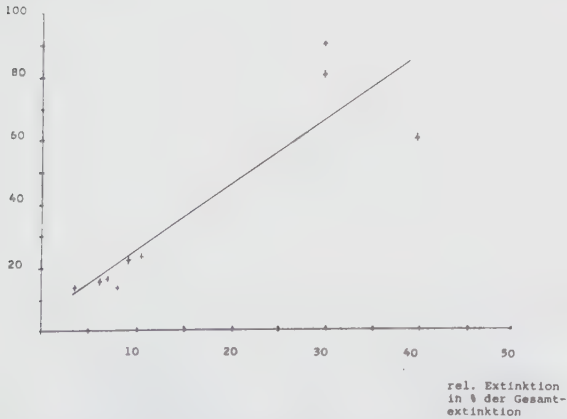


Abb. 10: Normaltyp prae- β -LP/VLDL $n = 10$
Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der
Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der
Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

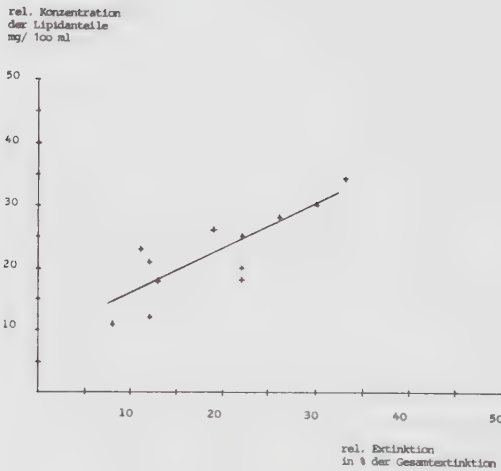


Abb. 11: Typ IIa Δ LP/HDL $n = 12$
Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

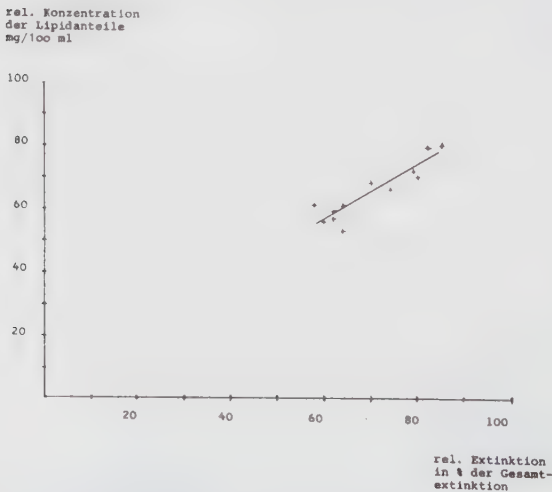


Abb. 12: Typ IIa β LP/LDL $n = 12$
Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

rel. Konzentration
der Lipidanteile
mg/100 ml

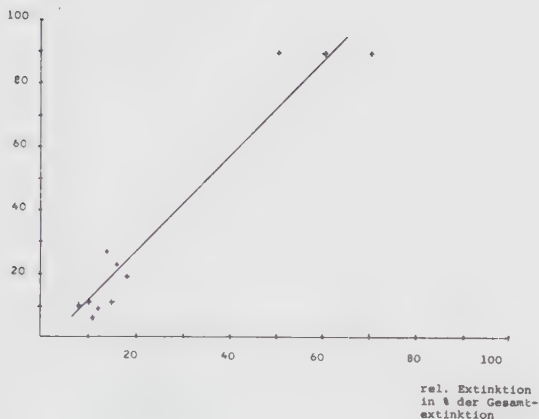


Abb. 13: Typ IIa pre- β LP/VLDL $n = 12$
Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

rel. Konzentration
der Lipidanteile
mg/100 ml

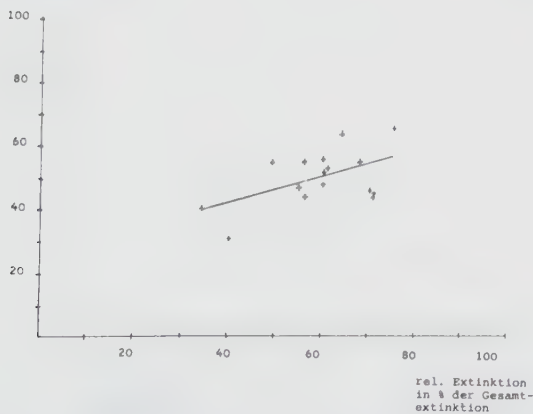


Abb. 14: Typ IIb α LP/HDL $n = 16$
Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

rel. Konzentration
der Lipidanteile
mg/100 ml

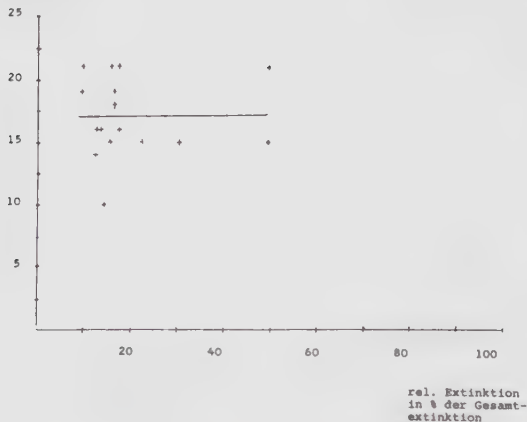


Abb. 15: Typ IIb β LP/LDL $n = 16$
Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

rel. Konzentration
der Lipidanteile
mg/100 ml

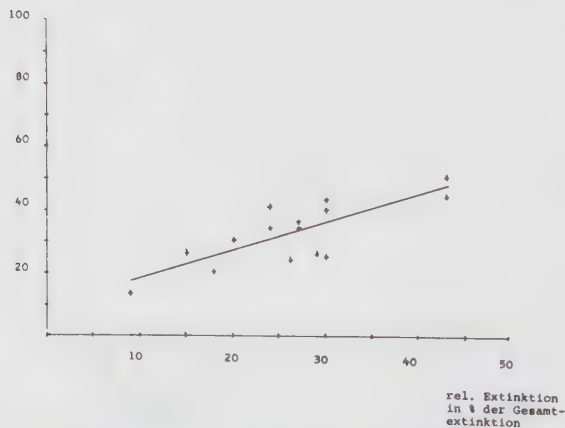
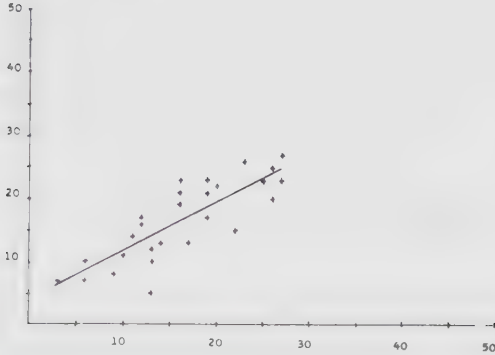


Abb. 16: Typ IIb prae β LP/VLDL $n = 16$
Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

rel. Konzentration
der Lipidanteile
mg/100 ml

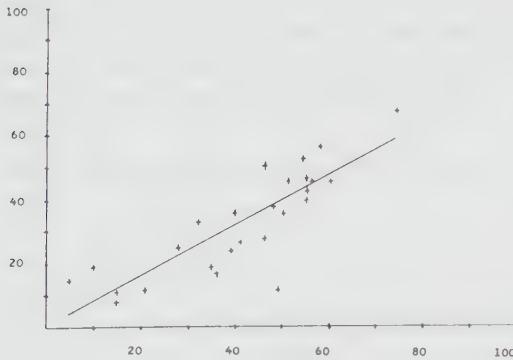


rel. Extinktion
in % der Gesamt-
extinktion

Abb. 17: Typ IV α LP/HDL n = 29

Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

rel. Konzentration
der Lipidanteile
mg/100 ml



rel. Extinktion
in % der Gesamt-
extinktion

Abb. 17: Typ IV β LP/LDL n = 29

Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

rel. Konzentration
der Lipidanteile
mg/100 ml

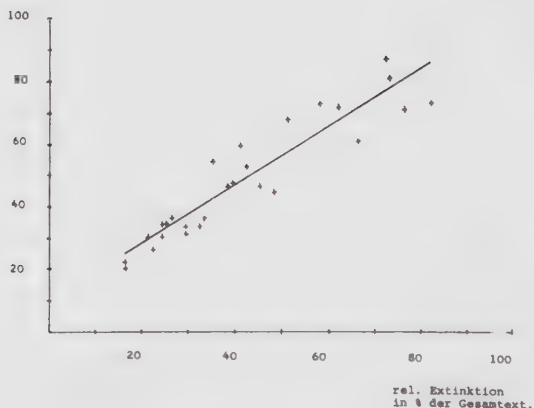


Abb. 18: Typ IV prae- β LP/VLDL $n = 19$
Quantitativer Vergleich der rel. Extinktionen der
Lipoproteinbanden mit den rel. Konzentrationen der
Lipidanteile der HDL, VLDL und LDL

Die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,30 und 0,971. Die beste Korrelation ergab sich beim Typ IIa, bei dem auch die geringste Streubreite in der Densitometrie (Tab. 1) und ein gutes Auflösungsvermögen der Lipoproteinbanden auf Celluloseacetatmembran (Tab. 2) festzustellen waren.

Die Ergebnisse des quantitativen Vergleiches sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

	Normalper- sonen	Typ IIa	Typ IIb	Typ IV
α -LP/HDL	R 0,922	0,820	0,030	0,832
	P 0,001	0,001	0,05	0,005
β -LP/LDL	R 0,676	0,917	0,527	0,835
	P 0,025	0,001	0,025	0,005
Prae β LP/ VLDL	R 0,898	0,971	0,794	0,932
	P 0,001	0,001	0,001	0,005

Tab. 3: Korrelationskoeffizienten (R) und Steigung (P)

Die unterschiedliche Steilheit der Regressionsgeraden (Tab. 3) könnte ihre Ursache in einem verschiedenen Färbekoeffizienten gegenüber Ölrot O bei einer unterschiedlichen Lipidzusammensetzung der einzelnen Lipoproteinaemiefractionen bei den verschiedenen Hyperlipoproteinaemietypen haben. Deshalb wurde von 100 Patienten die prozentuale Verteilung von Triglyceriden, Cholesterin und Phosphatiden in den einzelnen Lipoproteinfraktionen errechnet. (Tab. 4).

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei den untersuchten Hyperlipoproteinaemietypen.

	HDL			LDL			VLDL		
	TG	Chol	Phosph	TG	Chol	Phosph	TG	Chol	Phosph
Normalpersonen n = 25 (TG) 50-150mg/100ml (Chol) 190-250/100ml	13,1 ±4,6	29,3 ±4,2	54,4 ±7,7	11,2 ±2,3	51,7 ±5,0	37,2 ±3,9	69,4 ±7,2	17,3 ±6,1	12,1 ±6,0
Typ IIa n = 16 (TG) 50-150mg/100ml (Chol) 290-550mg/100ml	10,0 ±6,1	34,3 ±3,8	55,0 ±5,4	11,2 ±4,2	54,4 ±7,2	34,4 ±5,8	67,0 ±14,0	16,5 ±4,3	16,1 ±5,6
Typ IIb n = 26 (TG) 200-500mg/100ml (Chol) 300-500mg/100ml	20,3 ±5,9	29,1 ±6,4	50,0 ±8,0	12,5 ±3,9	52,6 ±4,3	35,3 ±4,9	67,7 ±5,9	16,4 ±3,4	16,0 ±6,1
Typ IV n = 30 (TG) 200-500mg/100ml (Chol) 200-300mg/100ml	22,0 ±8,0	27,1 ±8,7	50,1 ±9,0	13,0 ±6,4	51,0 ±6,1	36,3 ±4,8	70,4 ±7,0	15,5 ±5,6	14,5 ±6,9
Typ III n = 10 (TG) 300-900mg/100ml (Chol) 350-750mg/100ml	18,5 ±4,9	30,0 ±7,3	52,0 ±5,8	20,4 ±6,3	49,3 ±8,4	31,0 ±3,8	49,5 ±6,7	33,5 ±5,8	16,9 ±2,1

Tab. 4: Prozentuale Zusammensetzung des Lipidanteiles der HDL, LDL und VLDL aus Triglyceriden, Cholesterin und Phosphatiden bei Normalpersonen und verschiedenen Hyperlipoproteinämie-Typen. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung. n = Zahl der Untersuchungen

Die unteren und oberen Grenzen der Plasma-Triglycerid- bzw. Cholesterin-Konzentrationen sind vermerkt. (TG) bzw. (Chol) = Triglycerid- bzw. Cholesterin-Konzentration
TG = Triglyceride, Chol = Cholesterin, Phosph = Phosphatide

Die Konzentration des LDL-Cholesterins wird häufig als Maß für die Konzentration des Gesamt-LDL-Lipidanteils verwendet, da die Zusammensetzung der LDL-Fraktion bei den verschiedenen Hyperlipoproteinaemietypen nur gering variiert (Tab. 4). Die quantitative Erfassung dieser Fraktion ist entscheidend für die häufige Differentialdiagnose Typ I Ib - Typ III - Typ IV.

Es wurde deshalb untersucht, ob eine positive Korrelation zwischen der mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifuge ermittelten LDL-Cholesterinkonzentrationen und den mit Hilfe der Elektrophoresetechnik bestimmten β -Lipoproteinkonzentrationen besteht. Die Konzentration des Lipidanteils der β -Fraktion im Plasma wurde durch Multiplikation der relativen Extinktion der β -Bande mit der Gesamtlipidkonzentration (Summe aus TG, Chol, Phosphatiden) errechnet.

Die Abbildung 12 zeigt den Vergleich der beiden Parameter. Eine erhebliche Streubreite besteht beim Typ IV mit einer Triglyceridkonzentration von >500 mg/%. Die densitometrische Auswertung gibt somit keinen sicheren Hinweis für die Höhe der LDL-Konzentration.

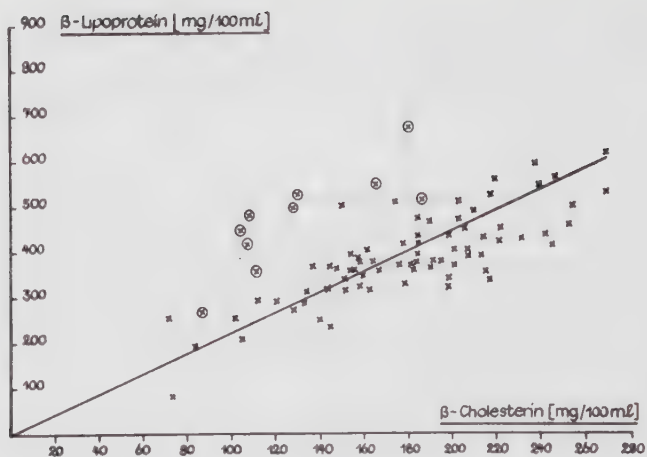


Abb. 19: Vergleich LDL-Cholesterinkonzentration
(Bestimmung nach Ultrazentrifugation)
mit β -Lipoproteinkonzentration
(Bestimmung nach Elektrophoresetechnik)

4. Diskussion

Für eine quantitative Auswertung der Lipoprotein-elektropherogramme müssten erstens eine scharfe Trennung der verschiedenen Lipoproteinbanden und zweitens eine gute Reproduzierbarkeit der densitometrisch ermittelten relativen Extinktionen der einzelnen Lipoproteinfraktionen vorausgesetzt werden.

Das Auflösungsvermögen bei Normalpersonen und bei Pat. mit Typ IIa und Typ IV mit Triglyceridwerten $< 1000 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ war gut, d.h. die verschiedenen Lipoproteinbanden waren deutlich voneinander getrennt. Beim Typ V, Typ IIb und hochgradigem Typ IV (Triglyceridwerte $1000 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) zeigte sich dagegen häufig keine ausreichende Trennung der verschiedenen Lipoproteinbanden, so daß eine densitometrische Auswertung nur begrenzt möglich war. Dies gilt per definitionem für den Typ III. Es muß jedoch hinzugefügt werden, daß durch Änderung im Färbeverfahren, speziell durch Verwendung einer Ozonkammer, die konstante und reproduzierbare Ozonisierungsbedingungen schafft, eine Verbesserung der Trennung der Lipoproteinbanden, insbesondere der prae- β - und β -Fraktionen ermöglicht.

Bei allen Hyperlipoproteinaemietypen war die Reproduzierbarkeit der densitometrisch ermittelten relativen Extinktionen brauchbar. (Standardabweichung max.: $\pm 5,5\%$).

Diese Ergebnisse müssen dahingehend interpretiert werden, dass das schlechte Auflösungsvermögen bei den Patienten mit Typ IIb, Typ III, Typ V und hochgradigem Typ IV trotz guter Reproduzierbarkeit der densitometrisch ermittelten Extinktionswerte eine quantitative Auswertung der Elektropherogramme a priori limitiert.

Die Frage einer quantitativen densitometrischen Auswertung von Elektropherogrammen durch Vergleich mit Ultrazentrifugenergebnissen konnte deshalb von vornherein nur in den Fällen mit guter Bandentrennung un-

tersucht werden. Da beim Typ III ($n = 20$) definitionsgemäß und beim Typ V ($n = 20$) ebenfalls immer eine schlechte Trennung der Lipoproteinbanden vorlag, wurden sie für die Untersuchung nicht berücksichtigt. Bei den restlichen auswertbaren Fällen ($n = 73$) zeigte der quantitative Vergleich bei Normalpersonen und bei Patienten mit Typ IIa und Typ IV mit Triglyceridwerten unter 1000 mg/ml eine gute Korrelation zwischen α LP/HDL, prae- β -LP/VLDL und β LP/LDL. (Korrelationskoeffizienten zwischen 0,820 und 0,971). Beim Typ IIb waren dagegen die Korrelationen bei den Lipoproteinfraktionen α -LP/HDL, β -LP/LDL und prae- β -LP/VLDL schlecht (Korrelationskoeffizienten zwischen 0,030 und 0,794).

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den untersuchten Hyperlipoproteinaemietypen in Bezug auf eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung der einzelnen Hyperlipoproteinaemiefractionen. Die unterschiedliche Anfärbbarkeit der einzelnen Lipoproteinbanden bei verschiedenen Hyperlipoproteinaemietypen kann demnach durch eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung nicht erklärt werden. Es muß daher eine in der Technik des Verfahrens oder eine von uns nicht erfasste Störung als Ursache für die Inkonstanz der Färbung angenommen werden (z.B. Alterung des Materials).

Bei kritischer Beurteilung zeigen die Ergebnisse, daß durch die Lipoproteinelektrophorese bei den häufig vorliegenden gleichzeitigen Erhöhungen der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen eine eindeutige Typisierung nicht möglich ist. Die Lipoproteinelektropherogramme bieten in diesen Fällen nicht die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung der Lipoproteinfraktionen (schlechtes Auflösungsvermögen der Banden, schlechte Korrelation zur präparativen Ultrazentrifugation).

Da viele Fälle vom Typ IIa und vom Typ IV durch die Lipidkonstellation im Plasma und durch Betrachten des Serums (klar/getrückt/kein Abrahmeffekt) zu differenzieren sind, kann die densitometrische Auswertung von Lipidelektropherogrammen in diesen Fällen nur eine Bestäti-

gung der Diagnose bringen. Eine Unterscheidung des Typ IIb vom Typ III ist nur durch den Nachweis "floating β " möglich. Typ IIb und Typ IV können nur durch den Nachweis des LDL-Cholesterins voneinander abgegrenzt werden. Die Wertigkeit der Lipoproteinelektrophorese auf Celluloseacetat-Membranen mit densitometrischer Auswertung ist also für die Differenzierung verschiedener Hyperlipoproteinaemietypen als gering anzusehen. Dementsprechend empfiehlt Iammarino, R.M. in einer Übersicht aus dem Jahre 1975 auch unter Berücksichtigung weiterer Elektrophoreseverfahren Lipoproteinelektrophoresen als Routineverfahren zur Differenzierung der Hyperlipoproteinaemietypen nicht zu verwenden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der densitometrischen Auswertung von Lipoproteinelektropherogrammen auf Celluloseacetat-Membranen der verschiedenen Hyperlipoproteinaemietypen im Vergleich zu quantitativen Ergebnissen durch die präparative Ultrazentrifugation die Frage untersucht, inwieweit die quantitative Auswertung der Lipoproteinelektropherogramme für eine exakte Typisierung der Hyperlipoproteinaemien brauchbar ist.

Es wurden die Reproduzierbarkeit und das Auflösungsvermögen der Lipoproteinelektropherogramme verschiedener Probanen (Normaltyp, Typ IIa, Typ IIb und Typ IV) untersucht und anschließend Korrelationen zwischen den relativen Extinktionen der α -, prae- β - und β -Lipoproteine und den relativen Lipidkonzentrationen der HDL, LDL und VLDL errechnet und graphisch dargestellt.

Die Frage, ob die quantitative densitometrische Auswertung von Lipidelektropherogrammen auf Celluloseacetat-Membranen die präparative Ultrazentrifugation zumindest teilweise ersetzen kann, muß dahingehend beantwortet werden, daß die Reproduzierbarkeit der Lipoproteinelektrophorese gut, das Auflösungsvermögen der Banden und die Korrelation zwischen den beiden Methoden bis auf den Typ IIb befriedigend sind.

Da definitionsgemäß der Typ III durch die Lipoproteinelektrophorese nicht erfaßt werden kann, erscheint die Lipoproteinelektrophorese - ob mit oder ohne densitometrische Auswertung - für die häufigste Differentialdiagnose Typ III, Typ IIb und Typ IV nicht geeignet.

Literaturverzeichnis

- 1) Albrink, U.J., Uligs, J.W.: American J. Med. 31 (1964)
4
- 2) Albrink, U.J., Man, E.B.: Arch. intern. Med. 103
(1959) 4
- 3) Klemens, U.H., Bremer, A., et alt.: Z. Ernährungs-
wiss. Suppl. 12 (1972) 61
- 4) Heinle, R.A., Levy, R.I., et alt: Americ. J. Casdiol.
24 (1969) 178
- 5) Kremer, G.J., Niemczyk, H., et alt: Münch. med.
Wschr. 115 (1973) 662
- 6) Wollenweber, J., Doenecke, P., et alt: Dtsch. med.
Wschr. 96 (1971) 103
- 7) Gertler, M.M., Rusk, H.A., et alt: Geriatrics 23
(1968) 135
- 8) Heyden, S., Hames, C.G.: Dtsch. Med. J. 22 (1971) 401
- 9) Pearce, J., Aziz, H.: J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.
33 (1970) 88
- 10) Report of the Intersociety Commiss. for Heart Dis.
Resonaces: Circulation 42 A. 55
(1970)
- 11) Kessler, J.J., Kniffen J.C., Janowitz H.D.: New Engl. J.
Med. 269 (1963) 943
- 12) Krauss, R.M., Levy, R.J., Fredrickson, D.S.: J. clin.
Invest. 54 (1974) 1107
- 13) Kudzma, D.J., Schonfeld, G.: J. Lab. clin. Med. 77
(1971) 384
- 14) Fredrickson, D.S., Levy, R.J.: Metabolic Basis of Inheri-
ted Disease, 3 id. Fel. Kap. 28
New York: Mc. Grave Hill 1972
- 15) Beaumont, J.L., Carlson, L.A., et alt: Bull. Wld. Hlth.
Erg. 43 (1970) 891
- 16) Greten, H., Brown, W.: Handbuch der Inneren Med. 5. Aufl.
Band 7 Springer Verlag 1976 Kap.
III 268-269.
- 17) Goldstein, J.L., Dana, S.E., et alt: Pioc. nat. Acad.
Sci. (Wash.) 72 (1975) 1092

- 18) Lees, R.S., Hatch, F.T.: J. Laborat. Clin. Med. S.
Louis 61 (1963) 518
- 19) Noble, R.P.: J. Lipid Res. 9 (1968) 693
- 20) Rapp, W., Kahlke, W.: Clin. Chem. Acta (Amsterdam) 19
(1968) 493
- 21) Greten, H., Seidel, D., Walter, B., Kolbe, J.: DMW 95
(1970) 1716
- 22) Narayan, K.A., Narayan, S., Kummerow, F.A.: Nature 205
(1965) 246
- 23) Narayan, K.A., Creinin, H.L., Kummerow, F.A.: J. Lipid
Res. 7 (1966) 150
- 24) Feliste, R., Dousset, M., Douste-Blazy, L.: Clin. Chim.
Acta 47 (1973) 329
- 25) Frings, C.S., Foster, O.B. Cohen, P.S.: Clin. Chem. 17
No 2 (1971) 111
- 26) Klemens, U.H., Knöchel, W., Löwis of Menar, von P.:
Serumproteine Verlag Chemie
Weinheim Bergstr. (1974) 125
- 27) Dahlen, G., Ericson, C., Furberg, C.: Acta Med. Scand.
Suppl. 531 (1972)
- 28) Charman, R.C., Landowne, R.A.: Analytical Biochem. 19
(1967) 177
- 29) Eggstein, M., Kreutz, F.H.: Klin. Wschr. 44 (1966) 262
- 30) Schmidt, F.H., Dahl, K. von: Z. klin. Chem. 6 (1968) 156
- 31) Zilversmith, D.B. et al: J. Lab. clin. Med. 35 (1950)
155
- 32) Klemens, U.H., Schmalbeck, J.: Z. klin. Chemie u. klin.
Biochemie 7 (1969) 540
- 33) Havel, R.J., Eder, H.A., Bragdan, J.H.: J. clin. Invest.
34 (1955) 1345
- 34) De Lalla, D.F., Gofman, J.W.: Meth. biochem. Anal 1
(1970) 166
- 35) Klemens, U.H., Schmalbeck, J.: Z. klin. Chemie u. klin.
Biochemie 8 (1970) 160
- 36) Iammarino, R.M.: Clin. Chemistry 21 (1975) 300

Lebenslauf

Am 27.2.1949 wurde ich, Wolfram Knöchel, als zweiter Sohn des Arztes Dr. med. Walter Knöchel und seiner Ehefrau Marianne, geb. Ewald, in ESSEN geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich in ESSEN die Albert-Schweitzer Grundschule. 1959 wechselte ich zunächst auf das Helmholtz-Gymnasium, dann auf das Gymnasium ESSEN-Werden über. Dort bestand ich im Juli 1967 das Abitur.

Zum Sommersemester 1968 begann ich an der Freien Universität Berlin das Medizinstudium. Nach dem Vorphysikum 1969, dem Physikum 1971 und dem Staatsexamen 1974 erhielt ich am 31. Okt. 1975 die Approbation als Arzt. November 1975 - Oktober 1976 Tätigkeit als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Anaesthesiologie im Klinikum Steglitz unter Leitung von Prof. U. Henneberg, ab November 1976 bin ich wissenschaftlicher Assistent bei Prof. G. Stüttgen in der dermatologischen Abteilung der Freien Universität Berlin im Rudolf-Virchow Krankenhaus.

DISSERTATIONS-DRUCK WALTER MONATH
Wichurastr. 58c Tel. 030/775 47 76/77 1 Berlin 46